

論文の内容の要旨

論文題目 Studies on regulatory mechanism of sperm motility in euryhaline teleost, tilapia

広塩性魚テラピアにおける精子の運動調節機構に関する研究

氏名 守田 昌哉

魚類精子は、それぞれの生息環境に適した性質を持っている。淡水魚、海水魚共に体液の浸透圧は海水の約 1/3 であり、精子は体液と同じ浸透圧(等張)である精巣内では静止している。そして浸透圧の異なる体外(淡水もしくは海水)に放出されると運動を開始する(Morisawa and Suzuki, 1980)。すなわち淡水魚では体内よりも浸透圧の低い低張環境にさらされることで運動を開始する、それに対して海水魚は高張環境で開始する。体液に対して低張または高張であることは全く逆の刺激である。それゆえこの浸透圧の差による運動の開始のシグナルは淡水魚と海水魚では異なっていると考えられる。

しかし広塩性魚であるテラピアは淡水から海水に順応し、さらには淡水から海水間での範囲でも繁殖する(Brock 1954)。このことから多くの魚類精子の運動性が低張もしくは高張の限られた範囲に適応しているのに対して、テラピアの精子は、低張から高張域に渡って運動をすることが予想される。このことから成魚の浸透圧順応に伴い、精子も順応した環境に適した運動性に変化することが予想される。つまり、テラピアでは生息環境に合わせて精子形成が変化すると考えられる。淡水もしくは海水に浸透圧順応したテラピア精子の運動性を研究する事で、他の淡水および海水魚の精子の運動制御機構の違いについて知見が得られるだけでなく、精子形成のダイナミズムの解明につながると期待される。

本論文において、テラピアでは飼育環境をかえることで 1) 精子の運動性が飼育環境に適した性質になり、また 2) 運動の活性化と関連したタンパク質のリン酸化カスケードが変化し、さらには 3) 精子内のタンパク質の発現にも変化が生じる、ことを明らかにした。

(1) 精子の運動性の変化

汽水域で採取した後、淡水に順応させたテラピア(以下 FWT)および海水に順応させたもの(以下 SWT)の精子を採取し、その運動を観察した。FWT 精子は浸透圧が低張の範囲で運動し、浸透圧が高くなる

につれて運動率が低くなった。また等張域付近では、細胞外 Ca^{2+} を加えることで運動率が若干上昇した。一方、低張域では細胞外 Ca^{2+} をキレートしても運動率は減少しなかった。それに対して SWT 精子は細胞外に Ca^{2+} を加えることで浸透圧の高い環境中(1000mOsm/kg)でも運動をしたが、細胞外 Ca^{2+} を完全にキレートすると運動を全く行わなかった。このことから FWT 精子は、低張で細胞外カルシウム濃度の低い淡水域に適しており、SWT 精子は高張で細胞外 Ca^{2+} 濃度の高い汽水から海水域に適していると考えられた。

精子の運動の仕組みを更に詳しく調べる為に、除膜精子(Triton model)を用いて運動に必要な細胞内要因を調べた。FWT および SWT の除膜精子共に、ダイニンの基質である Mg-ATP 存在下で Ca^{2+} 濃度が 10^{-6} M 以上の条件で運動が活性化した。また cAMP、cGMP は、活性化に必要ではなかった。さらに細胞内に Ca^{2+} 指示薬である Fluo-3 によって、FWT 精子では低張条件でのみ細胞外 Ca^{2+} 非依存的に上昇し、SWT 精子では細胞外 Ca^{2+} 依存的に低張から高張の広い範囲で上昇することが明らかとなった。

FWT 精子では、voltage dependent Ca^{2+} channel 阻害剤である Flunarizine、Ryanodine receptor 阻害剤である Ruthenium red は運動を阻害しなかったが、phospholipase C 阻害剤である U-73122 は運動を阻害した。このことから、FWT 精子では、 Ca^{2+} channel を介さずに IP_3 依存的に活性化する Ca^{2+} ストアーが細胞内に存在し、 Ca^{2+} の供給源になっている可能性を示唆している。それにたいして SWT 精子では、Flunarizine および Ruthenium red が運動を阻害したが、U-73122 は運動を阻害しなかった。これらのことから SWT 精子では、 Ca^{2+} channel から Ca^{2+} が流入し Ryanodine receptor を活性化することで、 Ca^{2+} を供給していることを示唆している。 Ca^{2+} ストアーとしては小胞体状のものを含む sleeve が有力である。このような Ca^{2+} 供給経路の変化が、細胞外環境に適応した運動性の変化に寄与していると考えられる。

(2) 運動の活性化と関連したタンパク質のリン酸化カスケードの変化

細胞内 Ca^{2+} 上昇が運動に関係している事が(1)で示された。そこで $^{45}\text{Ca}^{2+}$ を用いて Ca^{2+} 結合タンパク質の検出を試みた所、2つのタンパク質がえられた。そのうちの一つは分子量および等電点からカルモジュリンと想定される。またカルモジュリンキナーゼ IV も精子鞭毛および sleeve に存在していた。これらのことから Ca^{2+} を介したリン酸化反応が運動に関係していると考えられた。サケ科魚類の精子および哺乳類の精子では、鞭毛運動の活性化時に様々なタンパク質のリン酸化が起ることが報告されている。テラピア精子でも運動活性化に伴い鞭毛タンパク質においてリン酸化及び脱リン酸化反応が起った。FWT 精子では運動活性化に伴い見かけ上の分子量 27、32、45、48、60 kDa の鞭毛タンパク質のセリン残基がリン酸化した。それに対して SWT 精子では 27、32、45、48、60 kDa の鞭毛タンパク質のセリン残基が脱リン酸化した。これらのタンパク質は高イオン強度抽出 (0.6 M NaCl)、低イオン強度抽出を行っても軸系に結合していた。一方 27、32kDa タンパク質は高イオン強度抽出によって可溶化するものとしなないものがあり、可溶化されるもののセリン残基は、淡水及び

海水テラピア共に運動に伴ってリン酸化した。これらのことから、高イオン強度により抽出されるタンパク質のリン酸化反応は変化しないが、軸糸に非常に強く結合したタンパク質のリン酸化反応に変化が生じている可能性が示唆された。これらのリン酸化反応は、Ca²⁺結合タンパク質のカルモジュリン阻害剤(W-7)で運動およびリン酸化が阻害されたことから、カルモジュリン依存的に起ると考えられた。また C キナーゼの阻害剤 (GF109203X)によって FWT 精子では運動及び運動に伴うリン酸化が阻害されたが、SWT 精子では運動及び脱リン酸化は阻害されなかった。これらのことは C キナーゼは FWT 精子のリン酸化反応に特異的に関係しており、SWT 精子の運動に伴う脱リン酸化反応には関係していないと考えられた。

(3) 生息環境変化に伴う精子タンパク質の発現の変化

FWT および SWT 精子タンパク質を、2 次元電気泳動法により分離しタンパク質を比較した所、SWT 精子において 18kDa タンパク質が、FWT 精子に比べて多く発現していた。またこの 18kDa タンパク質の N 末端からのアミノ酸配列を解析したところ Cu/Zn Superoxide dismutase (以下 SOD)と高い相同性を持っていた。このアミノ酸配列に対するペプチド抗体を作成し精子内での局在を調べたところ、鞭毛および sleeve の Triton 可溶画分に存在していた。

この SOD は radical である O₂を H₂O₂にする酵素である。近年、スーパーオキシドや一酸化窒素 (NOと O₂)が反応してパーオキシナイトライト(ONOO⁻)になりチロシン残基と結合し(ニトロ化)精子の運動調節機構に影響を与えるという報告がある(Herrero et al., 2001)。テラピア精子においても、パーオキシナイトライトが運動調節と関係しているか、運動に伴いニトロ化するタンパク質の検出を行った。FWT 精子では、運動に伴い 27、32、45、48、60 kDa の鞭毛タンパク質がニトロ化した。それに対して SWT 精子では 27、32、45、48、60 kDa の鞭毛タンパク質が脱ニトロ化した。これらのタンパク質は高イオン強度抽出 (0.6 M NaCl)、低イオン強度抽出を行っても軸糸に結合していた。27、32kDa タンパク質は高イオン強度抽出によって可溶化するものとし、可溶化されるものは、FWT 及び SWT 精子共に運動に伴ってニトロ化した。これらのニトロ化及び脱ニトロ化するタンパク質はリン酸化するタンパク質と分子量及び局在が一致することから、ニトロ化とリン酸化が相互作用しているとも考えられた。またパーオキシナイトライトの前駆物質である一酸化窒素(NO)の合成酵素(NOS)の阻害剤(N^G-nitro-L-arginine methyl ester: L-NAME)によって FWT 精子の運動が阻害された。また運動に伴ない起るニトロ化及びリン酸化も阻害されたことから、パーオキシナイトライトがリン酸化反応を調節し、鞭毛運動に帰結していることが示唆された。それに対して SWT 精子では、NOS 阻害剤は運動を阻害しなかった。また運動に伴う鞭毛タンパク質の脱ニトロ化、及び脱リン酸化を阻害しなかった。しかしながら SOD の阻害剤 (2-methoxyestradiol)は SWT 精子の運動を阻害し、また運動に伴う脱ニトロ化および脱リン酸化を阻害した。一方で、SOD 阻害剤は FWT 精子の運動、ニトロ化およびリン酸化を強く阻害しなかった。これらのことから FWT

および SWT 精子の運動調節機構の変化にはニトロ化の変化が関係していることが示唆された。

ニトロ化をおこすパーオキシナイトライトの量は一酸化窒素(NO)ではなくスーパーオキシド(O_2^-)の量で決まることが知られている(Wink et al., 1998)。スーパーオキシド(O_2^-)を除去する SOD 発現量の変化はパーオキシナイトライトの量の変化をもたらすとも考えられる。つまり SWT 精子での SOD の発現量の増加によりパーオキシナイトライトの量を減少することにより、ニトロ化およびリン酸化反応の変化していると予想された。これらのことから生息環境の変化による精子鞭毛の運動調節機構の変化が radical の調節と関係している可能性がある。

本研究によってテラピア精子の運動調節機構の概要が明らかにされ、それらが浸透圧順応に伴って変化するダイナミックな機構が明らかにされた。